蓖麻蚕后部丝腺体丙氨酸-tRNA 和甘氨酸-tRNA 同功受体相对含量的变化

张伊平　　祁国荣
(中国科学院上海生物化学研究所)

摘要　用氨基酸选择性地保护相应的 tRNA 同功受体，使其 3′ 端羟基不被过碘酸氧化，去氨酰化后用 ^{32}pCp 标记、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的方法，分析了蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量的变化。从 5 龄期 24 小时到 85 小时，这两种 tRNA 同功受体的数目和电泳相对位置没有明显变化，$tRNA^{Ala}$ 主要分为四个同功受体，$tRNA^{Gly}$ 主要为三个。$tRNA^{Ala}$ 同功受体的相对含量有变化，其中 $tRNA^{Ala}_3$ 增加 10%，$tRNA^{Ala}_2$ 下降11%，$tRNA^{Gly}$ 同功受体的相对含量无明显变化。

关键词　蓖麻蚕　丝腺　丙氨酸转移核糖核酸　甘氨酸转移核糖核酸

转移核糖核酸(tRNA)对基因表达的调节控制作用有时通过一种或几种 tRNA 同功受体(isoacceptor)实现的。较早提出的调节假说认为，某些 tRNA 可能以少量或者变更的形式存在，在阅读信使核糖核酸(mRNA)上的信息时，成为限连因子。预选择假说(Osterman, 1979)作了进一步的解释。这假说认为，能识别相同密码子的几个同功受体可能属于不同的构象组，在某些情况下，一个同功受体的构象可能是唯一能用于正在进行翻译的 mRNA 上的某个密码子，从而成为调节因素。 Chavancy 和 Garel (1981) 认为 tRNA 的功能适应性表现在 mRNA 上同义密码子的频率与相应的 tRNA 同功受体分布的关系之中，扰乱 tRNA 群体就将影响同功受体的分布，使其与相应的 mRNA 上密码子频率的相关性失调，从而减慢蛋白质的合成速度，并发生错误的翻译。

与家蚕一样，蓖麻蚕后部腺体是一个高度分化的组织，其所合成的丝心蛋白的氨基酸组成具有明显的特征，其中丙氨酸和甘氨酸的含量占 76% 以上，这一特点对研究 tRNA 与蛋白质生物合成的关系带来了便利。辜祥荣等(1981)研究了蓖麻蚕后部腺体核酸与丝心蛋白含量的变化，在合成丝心蛋白最旺盛期，丙氨酸- tRNA ($tRNA^{Ala}$) 和甘氨酸-tRNA ($tRNA^{Gly}$) 含量的增加非常明显，可分别达到总 tRNA 量的 37.3% 和 33.5%。为了研究 tRNA 同功受体结构与功能的关系，本文分析了 5 龄不同时间蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量的变化。

材料和方法

T_4RNA 连接酶和多核苷酸激酶分别为中国科学院上海生化所和生化所东风厂生产。蓖麻蚕(白黄种)由中国农业科学院蚕业研究所提供。 r-^{32}p-ATP 为英国放化中心产品。dl-^{3}H-丙氨酸和 dl-^{3}H-甘氨酸为中国科学院上海原子核所产品。过碘酸钠为瑞士

本文于 1982 年 10 月收到。
本实验承中国农业科学院蚕业研究所吴冬秀等同志提供蓖麻蚕，我所曹功杰、李文琴同志给予帮助，特此致谢。

Fluka 厂产品。甲双丙烯酰胺为 Serva 产品。丙烯酰胺、鼠李糖、丙氨酸和甘氨酸均为国产试剂。

1. 蓖麻蚕后部丝腺体 将 5 龄期的蚕在蜕皮后 24 小时，55 小时和 85 小时分别解剖(时值七月，天气较热，蚕生长快，整个 5 龄期较短)，取出后部丝腺体，放入冰冷的 1.15% 氯化钾溶液中，－80℃ 冰箱中保存备用。

2. tRNA 的制备 参照 Kawakami 和 Shimura (1973) 的方法，解冻后的后部丝腺体加二倍体积 (V/W) 的 0.14M 氯化钠—0.01M 柠檬酸钠溶液，匀浆 3 分钟，离心弃沉淀，上清液加等体积 90% 苯酚，搅拌 30 分钟，离心取水相，加二倍体积 95% 乙醇沉淀过夜。离心，沉淀物用少量 1M 氯化钠溶解，离心除去大分子核酸，上清液加二倍体积 95% 乙醇沉淀，离心，沉淀物用少量 0.3M 氯化钠 —0.02M Tris-HCl (pH7.6) 溶解，然后对同一溶液透析。透析过的样品上 DEAE-Sephadex A-25 柱 (Cl^-型，事先用 0.35M 氯化钠—0.02M Tris-HCl pH7.6 平衡液平衡)，上柱后用平衡液洗涤至流出液 $A_{260} < 0.05$，再用 0.8M 氯化钠—0.03 M Tris-HCl pH7.6 洗脱。合并 $A_{260} > 0.5$ 部分，用乙醇沉淀，离心，干燥，低温保存(以上操作在冰浴或冰库中进行)。

3. 混合氨酰 tRNA 合成酶的制备 参照 Kawakami 和 Shimura (1973) 的方法，解冻后的后部丝腺体加二倍体积 (V/W) 缓冲液 I(0.02M Tris-HCl pH7.5，0.005M 氯化镁，0.025M 氯化钾，0.006 M2-巯基乙醇)，匀浆，离心弃沉淀。上清液再离心 120 分钟 (100,000 × G)，上清液加硫酸铵至 40% 饱和度，离心弃沉淀。上清液加硫酸铵至 80% 饱和度，离心，沉淀物以少量缓冲液 II (同缓冲液 I, 另加 0.35M 氯化钠)溶解，对此缓冲液透析，上 DEAE-Sephadex A-50 柱(预先用缓冲液 II 平衡)，收集色黄部分，对 45% 甘油的缓冲液透析，分管装后保存于 －20℃ 冰箱(以上操作在冰浴或冰库中进行)。

酶活力的测定：100 微升反应液中含 20μM Tris-HCl pH7.5，1μM 醋酸镁，1μM 2-巯基乙醇，1μM ATP，12.5nM ^{3}H-丙氨酸或 ^{3}H-甘氨酸 (5 微居里)，0.5—1A_{260} 单位 tRNA 和 10 微升氨酰 tRNA 合成酶。反应液在 37℃ 保温 20 分钟，反应液定量滴于新华 3 号滤纸，滤纸片用冰冷 10% 三氯醋酸浸泡 15 分钟，再用冰冷 5% 三氯醋酸洗涤 3 次，然后用乙醇：乙醚(1:1)和无水乙醚分别洗一次，烘干后用液体闪烁计数器测定放射性强度，以测定酶活力。

4. 选择性地保护 tRNA 3′ 末端羟基 参照 Traboni 等 (1980) 方法，略有变动。

(1) 去氨酰化 tRNA 60 毫克，加 3 毫升 0.1M Tris-HCl pH8.8，37℃ 保温 1 小时，冷却后对水充分透析，冻干。

(2) 氨酰化 反应液 500 微升中含 100μM Tris-HCl pH7.5，5μM 醋酸镁，5μM 2-巯基乙醇，5μM ATP，3 毫克 tRNA，75μM 丙氨酸 (或甘氨酸，对照组以蒸馏水代替)，150 微升氨酰 tRNA 合成酶液。反应液在 37℃ 保温 30 分钟，用等体积水饱和苯酚 (pH4.5) 抽提，离心后吸出水相，再用水相 1/2 体积的水饱和苯酚抽提，离心后吸出水相，用乙醇沉淀，沉淀物减压干燥。

(3) 过碘酸氧化 上述沉淀物加 100 微升 0.1M 高碘酸钠 (pH4.5 水溶液配制)，暗处反应 30 分钟，加 5 微升 1 M鼠李糖中止反应，乙醇沉淀，离心，沉淀物干燥。

(4) 脱氨酰基 上述沉淀物加0.2毫升0.5M赖氨酸 (pH8.8)，37℃ 保温 30 分钟，乙

醇沉淀，离心，沉淀物干燥。

5. [5-^{32}P] 胞苷 3.5 双磷酸 (Cp) 参照李其梁等 (1979) 方法，40 微升反应液中含 50mM Tris-HCl pH7.6，10mM 氯化镁，10mM 二硫苏糖醇，200 微居里 r-^{32}p-ATP，29nM 胞苷双磷酸，20 个单位多核苷酸激酶，37℃ 保温 40 分钟，滴于新华 3 号滤纸，电泳(缓冲液为 5% 乙酸，0.5% 吡啶，0.1%EDTA，pH3.5)，3,500 伏，15 分钟，自显影定位，用水洗脱 ^{32}pCp，冻干。

6. tRNA 3′ 末端的标记 参照 England 和 Uhlenbeck (1978) 方法，10 微升反应液中含 50mM Tris-HCl pH8.3，10% 二甲基亚砜，1mM 二硫苏糖醇，20mM 氯化镁，0.4—0.8A_{260} 单位 tRNA，5—10 微居里 ^{32}pCp，1 个单位 T_4RNA 连接酶，反应液在 4℃ 反应 20 小时，冻干。

7. 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 上述冻干样品加溴酚蓝、二甲苯蓝饱和尿素指示剂后，上 10% 凝胶板(20×40 厘米，胶厚 1.5 毫米)，电泳，500 伏，10 毫安，约 24 小时，缓冲液为 0.089M Tris-硼酸 pH8.3，含 EDTA 二钠盐 2.5mM。自显影定位，割带埋于 20% 胶中，进行第二向电泳(10×20 厘米，胶厚 1.5 毫米)，300 伏，10 毫安，约 48—55 小时，电泳缓冲液同第一向。自显影鉴定，割胶，计数。

结 果 与 讨 论

蓖麻蚕与家蚕虽然同为鳞翅目，但属于不同的科，两者的丝腺体形态有很大差别，丝心蛋白的氨基酸组成也不相同，蓖麻蚕丝心蛋白中丙氨酸含量最高，而家蚕丝心蛋白中甘氨酸最高(祁国荣，1978)，这种差别也表现在 tRNA 同功受体水平上。

蓖麻蚕从蜕皮进入 5 龄 24 小时到 85 小时 (相当于家蚕的生长期到丝心蛋白合成期)，$tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 没有出现新的同功受体，其双向凝胶电泳的相对位置也没有明显不同，$tRNA^{Ala}$ 相对含量则有所变化。

1. 混合 tRNA 双向凝胶电泳图谱

后部丝腺体混合 tRNA 用 ^{32}pCp 标记后，经双向凝胶电泳分离，可分辨出四十多个

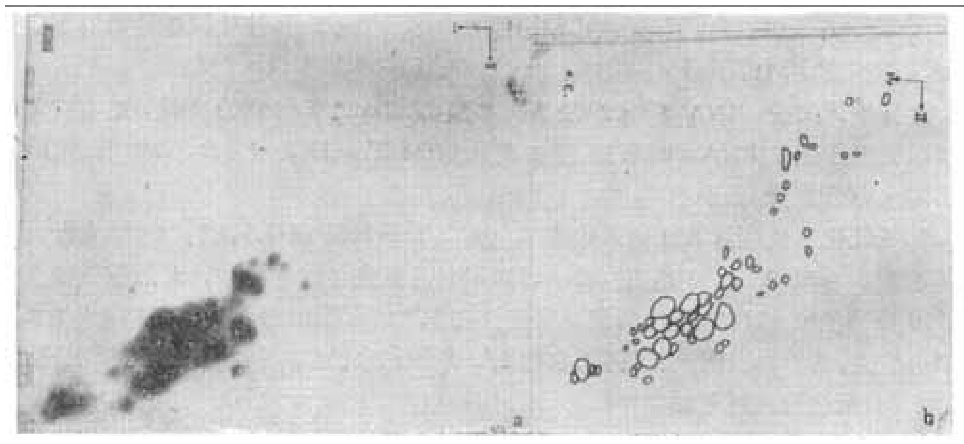


图 1 蓖麻蚕后部丝腺混合 tRNA (5 龄 24 小时)双向凝胶电泳图谱

a. 电泳图谱，b. a 的图解表示，

I 第 I 向为 10% 的胶， II 第 II 向为 20% 的胶，X.c 为二甲苯蓝。

点(见图 1：a、b 照片上有些点看不清)。5 龄 24 小时和 55 小时的图谱无明显差别，说明 tRNA 同功受体的数目无明显增加或减少，电泳行为也基本不变。真核生物 tRNA 的种类一般为 55±5 个，家蚕混合 tRNA 经双向凝胶电泳分离，可分辨出 53 个点 (Garel 等，1977)。因此，本图谱中有些点可能是重叠的。另外，在 4.5S 区域的一些点可能为 tRNA 的前体。

2. $tRNA^{Ala}$ 同功受体相对含量变化

用方法 4 制备的 $tRNA^{Ala}$ 以 ^{32}pCp 标记，双向凝胶电泳分离后主要可分为四个点(见图 2)，$tRNA_2^{Ala}$ 在 24 小时的相对含量最高，到 85 小时下降 11%，$tRNA_3^{Ala}$ 随时间的增长含量上升明显，到 85 小时达 10%，$tRNA_1^{Ala}$ 和 $tRNA_4^{Ala}$ 变化较小(见表 1，图 4)。

表 1　蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量(%)

时间 / 同功受体种类	五龄 24 小时	五龄55小时	五龄85小时
$tRNA_1^{Ala}$	33	36	30
$tRNA_2^{Ala}$	41	36	30
$tRNA_3^{Ala}$	19	21	29
$tRNA_4^{Ala}$	7	6	12
$tRNA_1^{Gly}$	35	37	35
$tRNA_2^{Gly}$	33	33	33
$tRNA_3^{Gly}$	32	30	32

5 龄 55 小时的 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$，85 小时的 $tRNA^{Ala}$ 均为三次实验结果的平均值。
5 龄 24 小时的 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$，85 小时的 $tRNA^{Gly}$ 均为二次实验结果的平均值。

Sprague 和 Hagenbüchle (1977) 报道家蚕后部丝腺体的 $tRNA_1^{Ala}$ 和 $tRNA_2^{Ala}$ (用同位素前标记法，分别为 10% 凝胶电泳后第一和第一条带) 的比值，在 4 龄后期为 0.35，5 龄第一天为 1.0，到第三天时上升至 2.0，第七天则略降为 1.7。在中部腺体及蚕体其他组织中，$tRNA_1^{Ala}$ 的含量很少或者几乎没有。因此，他们认为 $tRNA_1^{Ala}$ 是后部腺体特有的产物，它的快速积累与后部腺体丝心蛋白的大量合成有关。蓖麻蚕后部腺体的 $tRNA_1^{Ala}$ 与 $tRNA_2^{Ala}$ 之间这种比例关系并不存在。从 5 龄 24 小时到 85 小时，$tRNA_2^{Ala}$ 的相对含量始终不低于 $tRNA_1^{Ala}$，而 $tRNA_3^{Ala}$ 的变化较明显，因此，可能 $tRNA_3^{Ala}$ 与丝心蛋白的合成关系较大。

3. $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量变化

用方法 4 制备的 $tRNA^{Gly}$ 以 ^{32}pCp 标记，经双向凝胶电泳分离，主要可分为三个点(见图 3)，从 5 龄 24 小时到 85 小时，三个同功受体相对含量的变化都不明显 (见表 1，图 5)。

Chen 等(1974)用反向柱层析法将家蚕后部腺体 $tRNA^{Gly}$ 分为两个峰。在 5 龄第三天，峰 II 与峰 I 之比为 0.4，而到第五天两者之比为 0.62。另外，从 5 龄蚕体生长期 V_1 (相应于 1—2 天)到丝心蛋白合成期 V_8 (相应于 7—8 天)，家蚕体内 $tRNA^{Gly}$ 同功受体酰化程度有所变化。Delaney 和 Siddiqui (1975) 用 BD-纤维素柱层析分离，家蚕的 $tRNA^{Gly}$ 可分为三个峰(分别为 A、B、C)，在 V_8时，这三个峰的酰化程度都很高(80% 以上)，而在

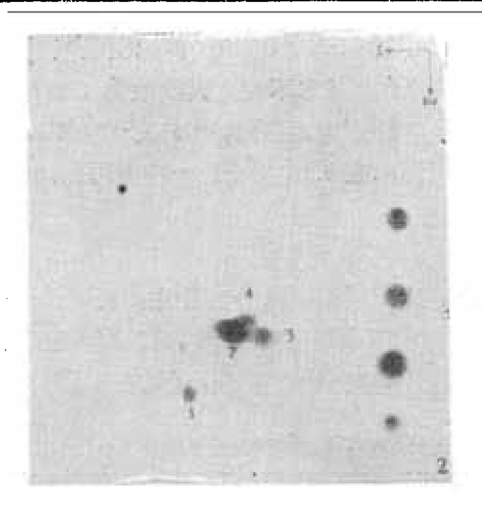


图 2 蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 同功受体（5 龄 24 小时）双向凝胶电泳图谱
1—4 分别为四个 $tRNA^{Ala}$ 同功受体。第 I 向为 10% 的胶，第 II 向为 20% 的胶。电泳条件见正文。

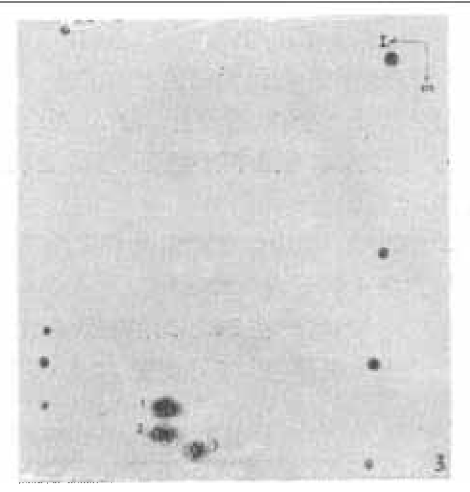


图 3 蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Gly}$ 同功受体（5 龄 24 小时）双向凝胶电泳图谱
1—3 分别为三个 $tRNA^{Gly}$ 同功受体，第 I 向为 10% 的胶，第 II 向为 20% 的胶，电泳条件见正文。

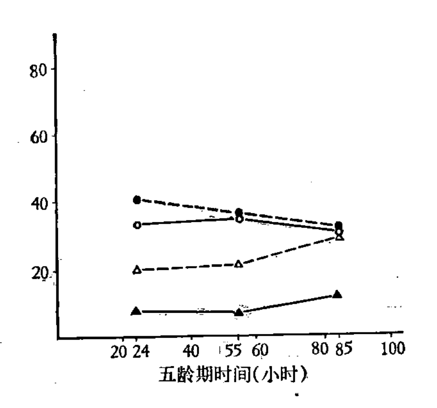


图 4 蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 同功受体相对含量变化
○—○为 $tRNA_1^{Ala}$ ●---●为 $tRNA_2^{Ala}$
△----△为 $tRNA_3^{Ala}$ ▲—▲ 为 $tRNA_4^{Ala}$

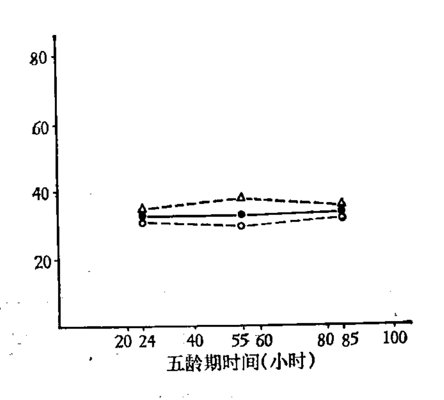


图 5 蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量变化
△----△为 $tRNA_1^{Gly}$ ●—●为 $tRNA_2^{Gly}$
○----○为 $tRNA_3^{Gly}$

V_1 时，峰 C 只有 60% 酰化，峰 B 88% 酰化。蓖麻蚕后部腺体 $tRNA^{Gly}$ 同功受体相对含量变化不大，可能这些同功受体比较均等地参与丝心蛋白的合成。

4. 对照组 tRNA

对照组 tRNA（在方法 4 中未用氨基酸保护的 tRNA）经过碘酸氧化去除 3′ 末端羟基，在单向或双向凝胶电泳后，未出现 ^{32}pCp 标记的点（见图 6），说明这方法专一性强，适宜于在混合的 tRNA 中选择性地标记某种 tRNA 同功受体。

近年来，tRNA 一级结构的测定发展较快，使用较多的为凝胶直读法，这些方法首先将已纯化的样品用同位素标记 5′ 端或 3′ 端，然后用各种专一性的核酸酶降解，或用专一性化学法裂解标记产物，经电泳分离后可直接在凝胶板上读出待测样品的核苷酸排列顺

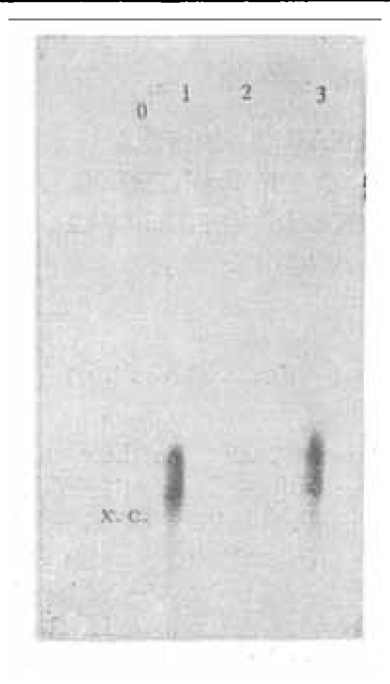


图 6 蓖麻蚕后部丝腺体 $tRNA^{Ala}$ 和 $tRNA^{Gly}$ 的 10% 凝胶电泳图谱
0.为原点， 1.为 $tRNA^{Ala}$，
2.为对照组 tRNA，3. 为 $tRNA^{Gly}$
×. c.为二甲苯蓝，电泳条件见正文。

序。本实验中所得到的正好为 ^{32}p 标记 3′ 端的一组 tRNA 同功受体样品，因此不需要进一步纯化，即可直接用凝胶直读法测定各个同功受体的一级结构，这就为研究同功受体结构与功能的关系提供了很大方便。

参 考 文 献

祁国荣 1978 关于家蚕核糖核酸结构的研究。国外蚕业科技参考资料。**6**：1—14。

李其梁等 1979 一种新的标记核糖核酸3′末端的方法。生物化学与生物物理学报 **11**：319—24。

辜荣祥等 1981 蓖麻蚕后部丝腺体核酸及丝蛋白含量的变化。昆虫学报 **24**(4)：349—55。

Chavancy, G. and Garel, J. P. 1981 Does quantitative tRNA adaptation to codon content in mRNA optimize the ribosomal translation efficiency? Proposal for a translation system model. *Biochimie* **63**: 187—95.

Chen, G. S. et al. 1974 Involvement of glycine transfer ribonucleic acids in development of the posterior silkgland of *Bombyx mori*. *Archs. Biochem. Biophys.* **161**: 109—17.

Delaney, P. and Siddiqui, M. A. Q. 1975 Changes in vivo levels of charged transfer RNA species during development of the posterior silkgland of *Bombyx mori*. *Devel. Biol.* **44**: 54—62.

England, T. E. and Uhlenbeck, O. C. 1978 3′-Terminal labelling of RNA with T_4RNA ligase. *Nature* **275**: 560—1.

Garel, J. P. et al. 1977 Transfer RNA in posterior silk gland of *Bombyx mori*: polyacrylamide gel mapping of mature transfer RNA, identification and partial structural characterization of major isoacceptor species. *Biochemistry* **16**: 3618—24.

Kawakami, M. and Shimara, K. 1973 Fractionation of glycine, alanine, and serine transfer ribonucleic acids from the silk gland. *J. Biochem.* **74**: 33—40.

Osterman, L. A. 1979 Participation of tRNA in regulation of protein biosynthesis at the translational level in eukaryotes. *Biochimie* **61**: 323—42.

Sprague, K. U. and Hagenbüchle, O. 1977 The nucleotide sequence of two silkgland alanine tRNAs: implication for fibroin synthesis and for initiator tRNA structure. *Cell* **11**: 561—70.

Traboni, C. et al. 1980 Selective ^{32}P-labelling of individual species in total tRNA population. *Nucleic acids Res.* **8**: 5223—32.

CHANGES OF ISOACCEPTING $tRNA^{ALA}$ AND $tRNA^{GLY}$ CONTENTS IN THE POSTERIOR SILKGLAND OF THE ERI-SILKWORM *PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI* DURING THE FIFTH LARVAL INSTAR

ZHANG YI-PING QI GUO-RONG
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

The amounts of isoaccepting $tRNA^{Ala}$ and $tRNA^{Gly}$ in the posterior silkgland of the Eri-silkworm *Philosamia cynthia ricini* were analysed by selective ^{32}P-labeling of individual species in total tRNA population. There were no evident differences in the numbers and electrophoretic behavior of iso-$tRNA^{Ala}$ and iso-$tRNA^{Gly}$ species from 24 hours to 85 hours during the fifth larval instar. $tRNA^{Ala}$ was mainly divided into four species and $tRNA^{Gly}$ three after two-dimensional polyacrylamide electrophoresis. The amounts of iso-$tRNA^{Ala}$ changed, $tRNA_3^{Ala}$ increasing 10% and $tRNA_2^{Ala}$ decreasing 11%. There were no remarkable changes in the amounts of iso-$tRNA^{Gly}$.

Key words *Philosamia cynthisricini*—silkgland— $tRNA^{Ala}$— $tRNA^{Gly}$